

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **05-271291**

(43)Date of publication of application : **19.10.1993**

---

(51)Int.Cl.

C07K 13/00  
A61K 37/02  
A61K 37/02  
// C12N 15/62  
C12N 15/70  
C12P 21/02  
(C12P 21/02  
C12R 1:19 )

---

(21)Application number : **03-238935**

(71)Applicant : **TAKARA SHUZO CO LTD**

(22)Date of filing : **27.08.1991**

(72)Inventor : **AZUMA ICHIRO**

**SAIKI IKUO**

**TAGUCHI YUKI**

**KIMIZUKA FUSAO**

**KATO IKUNOSHIN**

---

(30)Priority

Priority number : **03117886** Priority date : **23.04.1991** Priority country : **JP**

---

## (54) FUNCTIONAL POLYPEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new functional polypeptide having a combination of cell-adhesive activity and metastasis-inhibitory activity.

CONSTITUTION: The objective functional polypeptide of formula A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub> (A is polypeptide with sequence identical with Pro1239-Ser1515 in the cell-adhesive domain of human FN; B is polypeptide with sequence identical with Asn1782-Tht1870 in the heparin-bound domain of human FN; C is polypeptide with sequence identical with Ala1871-Thr1960 in the heparin-bound domain of human FN; m and n are each 1 or 0, where, m+n≤1). This polypeptide can be obtained by binding a polypeptide derived from fibronectins. Its manifestation by Escherichia coli has been confirmed.

This polypeptide has metastasis-inhibitory activity; besides, contributing to the repair of the tissues at wounded sites and to maintaining homeostasis.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-271291

(43)公開日 平成5年(1993)10月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 13/00	Z NA	8619-4H		
A 61 K 37/02	ADS			
	ADU	8314-4C		
// C 12 N 15/62				
15/70				

審査請求 未請求 請求項の数2(全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-238935	(71)出願人	591038141 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22)出願日	平成3年(1991)8月27日	(72)発明者	東市郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
(31)優先権主張番号	特願平3-117886	(72)発明者	済木育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目12-6
(32)優先日	平3(1991)4月23日	(72)発明者	田口由紀 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 宝酒造株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本(J P)	(74)代理人	弁理士 中本宏(外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能性ポリペプチド

(57)【要約】

【目的】細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ新規な機能性ポリペプチドを提供する。

【構成】一般式(化1) : A - (B)<sub>m</sub> - (C)<sub>n</sub>  
(式中Aは、配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは、配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは、配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nは1又は0の数を示す。但し m、nの和は1以上である)で表される機能性ポリペプチド。フィブロネクチン由来のポリペプチドの結合等により製造される。大腸菌による発現も確認した。

【効果】ガン転移抑制作用のほか、創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式（化1）：

【化1】 $A - (B)_m - (C)_n$ 

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とするガン転移抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくは細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を有する新規なポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】フィブロネクチン（以下、FNと表示する）は、血漿や細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質で、多彩な機能を持つことが知られている〔アニュアルレビュー オブ バイオケミストリー( Annual Review of Biochemistry )、第57巻、第375～413頁（1988）〕。天然のFNを創傷治癒、点眼薬等の医薬品や化粧品に利用する試みがなされているが、血液から採取するために、供給に制限があること、コスト高であること、また、病原性の細菌やウイルス等による汚染の可能性があること等の理由により、実用化されていない。FNにはヘパリンに結合する領域（ヘパリン結合ドメイン）が2所存在し、1所はN末端付近にあり、結合にCaイオンが必要であることが知られている。もう一方の領域はC末端付近にあり、この領域へのヘパリンに対する結合活性は、前述の領域よりも強く、しかもCaイオンに影響されない。最近の研究からFNのヘパリン結合ドメインが、細胞接着ドメインと同様に線維芽細胞、内皮細胞、ある種のガン細胞等の接着、伸展、移動に重要な役割を果していることが次第に明らかとなってきた。FNのヘパリン結合ドメインは細胞の表層にあるプロテオグリカンに結合して、細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を引起すことにより、細胞の接着、伸展、移動等に寄与すると考えられる。したがって、細胞接着ドメイン構造とヘパリン結合ドメイン構造の両構造を持つポリペプチドは、細胞と細胞外マトリックスの両方に結合して創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与し、医薬品としての用途が期待できる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは特開平2-311498号公報に記載のヒトFNの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンクアーペプチドを介して結合した機能性ポリペプチドを創製し、該ポリペプチドがガン転移抑制作用等の生理活性を示す

ことを既に見出している（特開平3-127742号、特願平1-306145号、同2-165727号各明細書）。ガン転移抑制作用、脈管形成抑制作用等の生理活性は、機能性ポリペプチドの構造、特に該ポリペプチドのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチドの構造により異なることより、更にヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造の異なる上記機能性ポリペプチドの開発が望まれている。本発明の目的は上記現状にかんがみ、ヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造の異なる細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ機能性ポリペプチド、及び該ポリペプチドを含有するガン転移抑制剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は機能性ポリペプチドに関し、下記一般式（化1）：

【化1】 $A - (B)_m - (C)_n$ 

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする。また本発明の第2の発明はガン転移抑制剤に関し、本発明の第1の発明の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とする。

【0005】配列表の配列番号1のアミノ酸番号1～277はヒトFNの細胞接着ドメインの Pro<sup>1239</sup>—Ser<sup>1515</sup>と同一配列であり、配列表の配列番号2はヒトFNのヘパリン結合ドメインの Asn<sup>1782</sup>—Thr<sup>1870</sup>と同一配列であり、配列表の配列番号3は同じくヘパリン結合ドメインの Ala<sup>1871</sup>—Thr<sup>1960</sup>と同一配列である。

【0006】なお、本明細書において、アミノ酸に付与された肩数字は、EMBLデータバンク（EMBL DATA BANK）のFNのcDNAを翻訳して得られるアミノ酸に付与されたN末端からのアミノ酸残基数を示す。

【0007】ヒトFNの遺伝子構造については、ジエンボジャーナル（The EMBO Journal）、第4巻、第1755～1759頁（1985）に記載されている。また、その細胞接着ドメイン及びヘパリン結合ドメインをコードするcDNAクローン（pLF5、pLF3、pLF4及びpLF5）についてはバイオケミストリー（Biochemistry）、第25巻、第4936～4941頁（1986）に記載されている。本発明者らは、pLF5から、細胞接着ドメインに対するcDNA断片を取り出し、これを発現ベクターに接続して大腸菌に導入することにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法を開発し特許出願した（特開平1-206998号）。本発明で必要とされる細胞接着ドメインのcDNAは、特開平1-206998号公報に記載されている組換え体プラスミドpTF7021を用いることができる。pTF7021

はFNのPro<sup>1239</sup>-Met<sup>1517</sup>(279アミノ酸残基)を発現するプラスミドである。pTF7021の翻訳領域のC末端の終止コドンの直前にクローニングサイト、例えばN<sub>c0</sub>Iサイトを導入することにより、細胞接着ドメインのcDNAと他のドメインのcDNAを連結させることができる。特開平2-311498号公報に記載のようにpTF7021にN<sub>c0</sub>Iサイトを導入したプラスミドはpTF7520と命名され、該プラスミド中にPro<sup>1239</sup>-Ser<sup>1515</sup>-Metの配列がコードされている。

【0008】ヘパリン結合ドメインについてはトリプシン、サーモライシン、カテプシンD等によって分解されて得られた断片が報告されており、その大きさは、29kDから38kDに及んでいる。ドメインの詳しい特定はなされていないが、一般的には約90アミノ酸から成るIII型類似配列を3個(III-12、III-13、III-14)と、それに続くIIIcs型配列の一部を含む断片が知られている。

【0009】ヘパリン結合ドメインをコードするcDNAは、pLF2435から取出すことができる。pLF2435は、前記pLF2、pLF3、pLF4及びpLF5から再構築されたプラスミドで、FNのヘパリン結合ドメインをコードするcDNAを含んでいる。pLF2435から必要なcDNA断片を制限酵素で切出し、5'側に開始コドンを含む合成DNAを、また、3'側には、終止コドンを含む合成DNAをDNAリガーゼで連結した後、適当な発現ベクターに接続することにより、特開平2-311498号公報に記載のIII型類似配列が3個つらなった配列を有するペプチド(H-271)を発現するプラスミドpHD101を得ることができる。

【0010】プラスミドpTF7520及びプラスミドpHD101については特開平2-311498号公報中に更に詳細に記述されている。CHV-179、CHV-90及びCHV-89は、それぞれヘパリン結合ドメインのIII型リピートのうち、III-13及びIII-14、III-14、及びIII-13が細胞接着ドメインポリペプチド(Pro<sup>1239</sup>-Ser<sup>1515</sup>)のC末端にメチオニン残基を介して結合したポリペプチドである。これらを発現するプラスミドは、例えば次のようにして構築することができる。ヘパリン結合ドメインのポリペプチド(H-271)をコードするプラスミドpHD101のIII-13のN末端、又はC末端に対応する領域にN<sub>c0</sub>Iサイトを導入し、N<sub>c0</sub>IとB<sub>aH</sub>Iで消化してIII-14、又はIII-13及びIII-14をコードするDNA断片を得る。これを細胞接着ドメインポリペプチドをコードしているプラスミドpTF7520(特開平2-311498号)のN<sub>c0</sub>I-B<sub>aH</sub>Iサイトに接続することにより、CHV-179及びCHV-90をそれぞれ発現するプラスミドpCHV179及びpCHV90が得られる。次いで、CHV-179を発現するプラスミドから、部位特異的変異の手法で、III-14をコードする配列を消失させることによ

り、CHV-89を発現するプラスミドpCHV89を得ることができる。

【0011】前記プラスミドにおける連結部には、N<sub>c0</sub>Iサイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれる。リンカーの有無は、本発明の効果を左右するものではないが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。また、任意のスペーサーを分子間距離の調節のため挿入することもできる。

【0012】配列表の配列番号4のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV89、配列表の配列番号5のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV179、配列表の配列番号6のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV90をそれぞれ例えば、大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノプロッティングが用いられる。組換え大腸菌の全菌体タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、泳動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体(FN-10、宝酒造)、及びFNのヘパリンドメインを認識するモロクローナル抗体(I ST-1又はI ST-2、セラ・ラブ社)等を用いて検出されるバンドが目的のポリペプチドである。目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。組換え大腸菌をL-ブロス等の培地に培養し、集菌した後、超音波処理により、菌体破碎液を得、これを遠心分離して上清を得る。上清を透析後、DEAEイオン交換体のカラムで分画し、次いで抗体カラム及び/又はヘパリンーアガロース等のアフィニティクロマトを行う。以上の操作により、目的のポリペプチドを精製することができる。

【0013】得られたポリペプチドは、BHKやNRK細胞に対する細胞伸展活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸展活性の測定は、例えばオスラティ(Ruoslahti)らの方法[メソッズ インエンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第82巻、第803~831頁(1981)]に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSAでブロッキングしたマイクロタイタープレートに、BHK又はNRK細胞の懸濁液を添加し、37℃で約1時間インキュベートした後、未吸着の細胞を洗浄した後、ホルマリン固定して、伸展した細胞の割合を顕微鏡下に測定することにより、細胞伸展の強さを測定することができる。一方、ヘパリン結合活性は、ヘパリンを結合した担体、例えばAF-ヘパリントヨパール(Toyopearl、東ソー)のカラムに試料を吸着させ、NaClの塩濃度を上昇させて溶出させ、溶出された塩濃度により、ヘパリンへの結合能力を示すことができる。

【0014】以上の測定により、本発明のポリペプチドはBHKやNRK細胞に対して強い細胞伸展活性を示すと共に、CHV-179、CHV-89はそれへパ

リンに対しても強い親和性を示すことが証明される。

【0015】本発明のポリペプチドを医薬として使用する場合、必要に応じて医薬用担体と共に常法により製剤化し、経口投与又は非経口投与すればよい。賦形剤あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ばれ、その種類及び組成は投与経路や投与方法によって異なる。例えば液状担体として水、アルコール類若しくは大豆油、オリーブ油、ミネラル油等の動植物油、又は合成油が用いられる。固体担体としてマルトース、シュークロースなどの糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウムなどの有機酸塩などが使用される。

【0016】注射剤の場合は溶解液は生理食塩液、各種緩衝液、グルコース、イノシトール、マンニトール、ラクトースなどの糖類溶液、エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が望ましい。またイノシトール、マンニトール、ラクトース、シュークロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥製剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えば滅菌水、生理食塩液、ブドウ糖液、電解質溶液、アミノ酸溶液等静脈投与用液体に溶解させて投与することもできる。製剤中における本発明のポリペプチドの含量は製剤により異なるが、通常0.1～10重量%好ましくは1～98重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1～30重量%、好ましくは1～10重量%の有効成分を含むようにすることが望ましい。経口投与する場合には前記固体担体若しくは液状担体と共に、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、顆粒、粉剤は一般に5～100重量%、好ましくは25～98重量%の有効成分を含む。

【0017】投与量は、患者の年令、体重、症状、治療目的等により決定されるが治療量は一般に、非経口投与で1～100mg/kg/日、経口投与で5～500mg/kg/日である。

【0018】本発明のポリペプチドはB16メラノーマを用いる転移のモデル系にて有意な転移防止効果を示すもので、胃ガン、肺ガン、大腸ガン、乳ガン、前立腺ガン、子宮頸ガン、腎ガンなどガン細胞に対して良好に転移を防止せしめてなる有用なものである。

【0019】以上詳細に説明した様に、遺伝子工学的手法により、細胞接着活性とガン転移抑制剤活性を併せ持ち、新規な機能性ポリペプチドを効率よく提供することができる。該ポリペプチドは抗転移抑制剤としての用途のほか、脈管形成抑制剤、創傷治癒剤、生長促進剤等の医薬品として、また、化粧料、培養基材等として有用である。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

#### 【0021】実施例1

ヘパリン結合ドメインの一部と細胞接着ドメインポリペプチドとの融合タンパク質の構築

なお、図1は融合タンパク質を発現するプラスミドの構築工程を示す図である。Escherichia coli HB 101/pHD101 (FERM BP-2264) より調製したヘパリン結合ドメインをコードするプラスミドpHD101 (特開平2-311498号) を大腸菌BW313に導入し、ヘルパー・ファージM13K07を感染させてdUを含む一本鎖DNAを調製した。これをテンプレートとし、NcoI認識配列を含む配列表の配列番号6で表す合成DNAをプライマーとして、T4 DNAポリメラーゼを作用させ、相補鎖合成を行った。なお、プライマーは、ポリヌクレオチドキナーゼにより、あらかじめ5'末端をリン酸化した。得られた2重鎖DNAを大腸菌DNAリガーゼで環状化し、宿主菌の大腸菌BMH71-18mutS株に導入して、複製させた。得られた形質転換体からプラスミドを抽出しNcoIで切断してゲル電気泳動で約0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このようにして、ヘパリン結合ドメインのIII-13のN末端 (Asn<sup>1782</sup>) と、III-12のC末端 (Glu<sup>1781</sup>) をコードする配列の間にNcoIサイトを導入したプラスミドを得た。なお、この変異導入には市販の変異導入キット (ミュータンK、宝酒造) を用いた。このプラスミドを、NcoIとBamHIで消化してゲル電気泳動を行い、約0.54kbのバンドをゲルから抽出した。一方、Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) より前述の組換え体プラスミドpTF7021を調製し、次いで該プラスミドにNcoIサイトを導入した。NcoIサイトの導入は特開平2-311498号公報に記載のように、配列表の配列番号7で表すオリゴヌクレオチドを合成し、前出ミュータンKを用いて行い、プラスミドpTF7520を得た。前記0.54kbのDNA断片をNcoIとBamHIで消化したpTF7520とT4 DNAリガーゼで連結した後、大腸菌HB101に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、NcoIと、BamHIで消化したときに、0.54kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このプラスミドをpCHV179と命名した。pCHV179は、H-271のIII-12を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチド (Pro<sup>1239</sup>-Ser<sup>1515</sup>) がメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析によって確認した。pCHV179を導入した大腸菌HB101をEscherichia coli HB101/pCHV179と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微研菌寄第12183号 (FERM P-12183)〕。

【0022】同様にして、NcoIサイトを含む配列表の配列番号8で表す変異導入プライマーを用いて、pHD101に変異導入を行い、III-13のC末端 (Thr<sup>1870</sup>) と

III-14のN末端(Ala<sup>1871</sup>)をコードする配列の間にN<sub>co</sub>Iサイトを導入したプラスミドを得た。これをN<sub>co</sub>IとB<sub>am</sub>H Iで消化して約0.27kbのバンドを切り出し、pTF7520のN<sub>co</sub>I-B<sub>am</sub>H Iサイトに接続して、大腸菌HB101に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、N<sub>co</sub>IとB<sub>am</sub>H Iで消化したとき0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択し、このプラスミドをpCHV90と命名した。pCHV90は、H-271のIII-12とIII-13を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドを細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析により確認した。pCHV90を導入した大腸菌HB101をEscherichia coli HB101/pCHV90と命名した。

【0023】次いで、pCHV179から、III-14をコードする領域を欠失するために欠失導入プライマーとしてIII-13のC末端をコードする配列に相補的な配列と、ストップコドン以下の配列に相補的な配列とが直接結合した配列表の配列番号9で表す30塩基のオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとして前記の方法で相補鎖を合成し、DNAリガーゼで閉環した後、大腸菌BMH71-18mutSを形質転換し、得られたプラスミドをN<sub>co</sub>IとB<sub>am</sub>H Iで消化して、0.27kbの断片を生成するものを目的の変異体として選択した。最終的には、塩基配列分析により、変異を確認した。このようにして得られたプラスミドはH-271のIII-12とIII-14を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであり、該プラスミドをpCHV89と命名した。これを再び大腸菌HB101に導入して、得られた形質転換体をEscherichia coli HB101/pCHV89と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微研菌寄第12182号(FERM P-12182)〕。

#### 【0024】実施例2

CHV-89、CHV-90、及びCHV-179の大腸菌による生産と精製

pCHV89を導入したEscherichia coli HB101/pCHV89(FERM P-12182)を50μg/mlのアンピシリンを含む5mlのL-ブロス培地に接種し、37°C、1夜振とう培養した。これを500mlの同培地に接種して振とう培養し、660nmの吸光度が0.3のときに、2mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。次に遠心分離により集菌し、1mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、3μM p-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオライドを含む20mMトリス塩酸バッファー(pH 8.0)に懸濁した。これを超音波処理した後、遠心分離を行って25mlの上清を得た。上清をDEAE-トヨバル 650M(15ml)をカラム

に吸着させ、カラムを20mMトリス塩酸バッファー(pH 8.0)で洗浄後、バッファー中のNaCl濃度の上昇により吸着物を分画した。イムノプロッティングにより検出された目的画分を集め、20mMトリス塩酸バッファー(pH 8.0)で平衡化した抗体カラム(FN-10)を結合させたセファロース4B(10ml)に吸着させ、次に0.1M NaClを含む同バッファー、20mM酢酸アンモニウムの順に洗浄した後、40mM酢酸で目的画分を溶出した。その中でSDS-PAGEで单一のバンドを与える画分を集めて、脱脂、凍結乾燥した。このようにして500mlの培養菌体から約5mgのCHV-89を得た。このCHV-89の一部をプロテインシーケンサー(477A/120A、アプライドバイオシステムズ社)で分析して、N末端配列を確認した。また、カルボキシペプチダーゼP消化法により、C末端アミノ酸を確認した。

【0025】同様の方法により、pCHV179を導入したEscherichia coli HB101/pCHV179(FERM P-12183)を培養し、500mlの培養菌体から、約5mgのCHV-179を得た。また、pCHV90を導入したEscherichia coli HB101/pCHV90の500ml培養液から約4mgのCHV-90を得た。CHV-179、CHV-90のN末端アミノ酸、C末端アミノ酸も、上記と同様の方法でそれぞれ確認した。

#### 【0026】実施例3

##### 生物活性の測定

前記実施例2で得られた各ポリペプチドを用いて細胞接着活性、ヘパリン結合活性及びヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性を測定した。細胞接着活性は、ルオスラティラの方法〔メソツ インエンザイモロジー、第82巻、該803~831頁(1981)〕に準じて測定した。試料を蒸留水、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)等に溶かし、96穴マイクロプレート上で階段的に希釈した。4°C、2時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた(50μl/ウェル)。3%BSA(牛血清アルブミン)を含むPBS溶液を100μl/ウェル加え、37°C、1時間インキュベートしてプレートをロックした。PBSでプレートを洗浄後、あらかじめダルベッコ(Dulbecco's)イーグル最小栄養培地(DMEM)に5×10<sup>5</sup>細胞/mlとなるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞(BHK-21)を100μl/ウェル分注し、37°C、1時間インキュベートした。なお使用したBHK-21細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリプシン処理(37°C、5分)したもの用いた。PBSでプレートを洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。顕微鏡下でBHK-21細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、n-FNの高濃度における伸展細胞数の50%となる試料の濃度(E<sub>D50</sub>)を求め細胞接着活性の指標とした。

【0027】ヘパリン結合活性の測定は以下のようにした。20 mMリン酸バッファー (pH 7.0) で平衡化したAFヘパリントヨパール650Mのカラム (1.5 ml) に試料を乗せ、バッファー中のNaCl濃度を段階的に上昇させ、溶出される塩濃度によりヘパリンへの結合力を表した。

【0028】ヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性の測定は、試料1~2 μgをSDS-PAGEで分離し、これをセミドライブロッター（ザルトリウス社）を用いて、ニトロセルロースメンブランにプロッティングした。メンブランをプロッキング液（1% BSAを含むPBS）で処理した後、FNのヘパリン結合ドメインを認識するモノクローナル抗体（IST-1及び-2、セラ・ラブ社）を含むプロッキング液と約1時間インキュベートし、50 mM NaCl及び

0.05% NP-40を含む10 mMトリス・HClバッファー (pH 7.5) でメンブランを洗浄、更にNP-40を含まない上記バッファーでメンブランを洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識2次抗体（アマシャム社）を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、同様にメンブランを洗浄した。4-クロロ-1-ナフトル及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む50 mM NaCl-トリス・HCl (pH 7.5) 溶液にメンブランを浸して、メンブランにプロッティングされたバンドを発色させた。

【0029】以上のようにして得られた測定結果を表1に示す。なお、特開平2-311498号公報記載のC<sub>277</sub>-Met-H<sub>271</sub>を対照とし用いた。

#### 【0030】

#### 【表1】

表 1

試 料	細胞接着活性 (ED <sub>50</sub> 、nM)	ヘパリン結合活性 (溶出塩濃度、mM)	抗体との反応性	
			IST-1	IST-2
C <sub>277</sub> -Met-H <sub>271</sub>	176	300	有	有
CHV-179	176	300	有	有
CHV-90	176	150	無	無
CHV-89	176	300	有	有

#### 【0031】実施例4

次に本発明のポリペプチドの生理活性を示す。

##### (1) ガン転移抑制作用

C57BL/6 マウス（1群5匹）にB16-BL6 メラノーマ細胞3×10<sup>4</sup> 個と本発明のポリペプチド1000 μgを静脈内に注入する（細胞とポリペプチドをPBS中で混合し、その0.05 mlを静注する）。対照としてメラノ

ーマ細胞のみを静注し、対照群とする。メラノーマ細胞移植後14日に肺を摘出して、肺表面における転移結節数を実体顕微鏡を用いて測定する。その結果を表2に示す。

#### 【0032】

#### 【表2】

表 2

	投与量 μg/マウス	肺への転移数 平均±SD
対 照	—	4.5±7
CHV-89	1000	1.2±9
CHV-90	1000	1.1±5
CHV-179	1000	4±3

【0033】以上のように、本発明のポリペプチド投与群で、メラノーマの肺転移が抑制されている。

##### (2) 急性毒性試験

C57BL/6 マウスにCHV-89、CHV-90、CHV-179をそれぞれ静脈内投与した。100 mg/kgにおいて毒性は認められなかった。

#### 【0035】実施例5

次に、本発明のポリペプチドの製剤例を示す。なお各例において、部は重量部を意味する。

##### 【0036】製剤例1

CHV-89 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2 gを10 mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペ

チド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0037】製剤例2

CHV-90 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0038】製剤例3

CHV-179 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0039】製剤例4

CHV-89 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロビルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破碎して16～60メッシュの間にるように篩過し、顆粒とした。

【0040】製剤例5

CHV-90 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロビルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1					5				10				15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20			25		30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
						35			40			45		
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
						50			55			60		
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
						65			70			75		
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
						80			85			90		
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
						95			100			105		
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
						110			115			120		
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
						125			130			135		
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
						140			145			150		
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
						155			160			165		
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
						170			175			180		
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
						185			190			195		

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
 200 205 210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
 215 220 225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
 230 235 240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 245 250 255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
 260 265 270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met  
 275

配列番号 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 89

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

フラグメント型 : 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

鎖の数 : 1 本鎖

配列 :

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr  
 20 25 30  
 Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile  
 35 40 45  
 Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly  
 50 55 60  
 Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn  
 65 70 75  
 Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr  
 80 85

配列番号 : 3

トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 90

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

フラグメント型 : 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

鎖の数 : 1 本鎖

配列 :

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr  
 20 25 30  
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu  
 35 40 45  
 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr  
 50 55 60  
 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu  
 65 70 75  
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
 80 85 90

配列番号 : 4

鎖の数 : 1 本鎖

配列の長さ : 367

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
     1                     5                     10                     15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
     20                     25                     30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
     35                     40                     45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
     50                     55                     60  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
     65                     70                     75  
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
     80                     85                     90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
     95                     100                     105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
    110                     115                     120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
    125                     130                     135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
    140                     145                     150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
    155                     160                     165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
    170                     175                     180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
    185                     190                     195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
    200                     205                     210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
    215                     220                     225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
    230                     235                     240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
    245                     250                     255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
    260                     265                     270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg  
    275                     280                     285  
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp  
    290                     295                     300  
 Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val  
    305                     310                     315  
 Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp  
    320                     325                     330  
 Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr  
    335                     340                     345  
 Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
    350                     355                     360  
 Val Val Ile Asp Ala Ser Thr  
    365

配列番号 : 5  
 配列の長さ : 457  
 配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : ペプチド

## 配列 :

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1						5				10				15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20		25				30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
						35				40				45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
						50				55				60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
						65				70				75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
						80				85				90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
						95				100				105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
						110				115				120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
						125				130				135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
						140				145				150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
						155				160				165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
						170				175				180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
						185				190				195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
						200				205				210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
						215				220				225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
						230				235				240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
						245				250				255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg
						260				265				270
Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
						275				280				285
Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	
						290				295				300
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val
						305				310				315
Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp
						320				325				330
Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr
						335				340				345

Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
                          350                     355                 360  
 Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu  
                          365                     370                 375  
 Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln  
                          380                     385                 390  
 Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys  
                          395                     400                 405  
 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly  
                          410                     415                 420  
 Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr  
                          425                     430                 435  
 Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro  
                          440                     445                 450  
 Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
                          455

配列番号 : 6

鎖の数 : 1 本鎖

配列の長さ : 368

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
     1                  5                 10                 15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
     20                 25                 30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
     35                 40                 45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
     50                 55                 60  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
     65                 70                 75  
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
     80                 85                 90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
     95                 100                105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
    110                 115                120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
    125                 130                135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
    140                 145                150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
    155                 160                165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
    170                 175                180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
    185                 190                195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
    200                 205                210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
    215                 220                225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
 230 235 240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 245 250 255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
 260 265 270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn  
 275 280 285  
 Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp  
 290 295 300  
 Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu  
 305 310 315  
 Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro  
 320 325 330  
 Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu  
 335 340 345  
 Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu  
 350 355 360  
 Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
 365

配列番号 : 7

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

ハイポセティカル配列 : NO

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 1-26 E primer

配列 :

GCTGACATTG GCCATGGCTC CAGAGT 26

配列番号 : 8

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

ハイポセティカル配列 : NO

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 1-22 E primer

配列 :

CTATTACACC ATGGATGGTT TG 22

配列番号 : 9

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

ハイポセティカル配列 : NO

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 1-22 E primer

配列 :

ATCAATGGCC ATGGTGAGG CG 22

配列番号 : 10

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

ハイポセティカル配列 : NO

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 1-30 E primer

配列 :

AGCCGGATCC TATTAAGTGG AGGCGTCGAT 30

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpCHV179、pCHV89、及びpCHV90をそれぞれ構築するための工程図である。

## 【手続補正書】

【提出日】平成4年1月27日

## 【手続補正2】

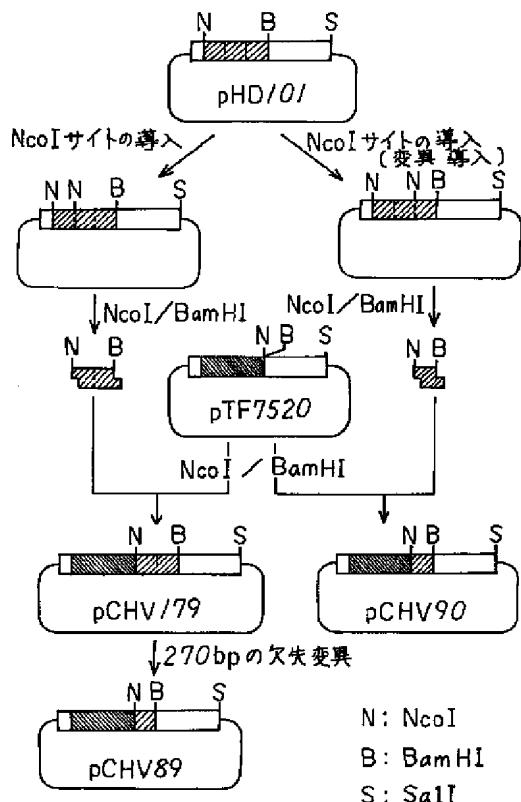
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】追加

【補正内容】

## 【図1】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 21/02

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19)

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 8214-4B

(72) 発明者 君塚 房夫

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賽酒造  
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賽酒造  
株式会社中央研究所内